



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets

A61K 31/205

A1

(38) Numéro de publication internationale

319651526

(43) Date de publication internationale: 8 septembre 2000 (08.09.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE00/00021

(22) Date de dépôt international: 1er mars 2000 (01.03.00)

(30) Données relatives à la priorité:  
9900144 2 mars 1999 (02.03.99) BE(71)(72) Déposant et inventeur: MESSADEK, Jallal [BE/BE]; 2,  
place des Béguinages, B-4000 Liège (BE).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: ANTITHROMBOTIC USE OF GLYCINE BETAINE

(54) Titre: LA GLYCINE BÉTAÏNE POUR SON USAGE ANTITHROMBOTIQUE

(57) Abstract

The invention concerns the use of glycine betaine to eliminate physiopathological vascular diseases. The invention concerns the curative and preventive activity of glycine betaine in the pathogenesis of thromboembolic and hemostatic diseases of arterial or venous origin. Glycine betaine has a preventing activity by inhibiting the formation of thrombi and a curative activity inhibiting the proliferation of thrombi by eliminating them. The invention is characterised in that glycine betaine does not present any risk of haemorrhage or allergy contrarily to molecules and treatments currently used. The invention also concerns the use of glycine betaine as anticoagulant for blood preservation.

(57) Abrégé

L'invention consiste en l'utilisation de la glycine bétaine pour éliminer les atteintes physiopathologiques vasculaires. L'invention se rapporte à l'activité curative et préventive de la glycine bétaine dans la pathogénie des maladies thrombo-emboliques et hémostatiques d'origine artérielle ou veineuse. La glycine bétaine a une activité préventive en empêchant la formation des thrombi et une activité curative empêchant la prolifération des thrombi en les détruisant. L'intérêt de l'invention réside dans le fait que l'utilisation de la glycine bétaine ne présente aucun risque hémorragique ou allergique par opposition aux molécules et traitements actuellement utilisés. L'invention consiste également en l'utilisation de la glycine bétaine comme anti-coagulant pour la conservation du sang.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                                       |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                    | LS | Lesotho                               | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                   | LT | Lituanie                              | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France                                     | LU | Luxembourg                            | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon                                      | LV | Lettonie                              | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                | MC | Monaco                                | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                    | MD | République de Moldova                 | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana                                      | MG | Madagascar                            | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée                                     | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce                                      | ML | Mali                                  | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                    | MN | Mongolie                              | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                    | MR | Mauritanie                            | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël                                     | MW | Malawi                                | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                    | MX | Mexique                               | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie                                     | NE | Niger                                 | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon                                      | NL | Pays-Bas                              | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya                                      | NO | Norvège                               | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                               | NZ | Nouvelle-Zélande                      | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne                               |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                        | PT | Portugal                              |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakstan                                  | RO | Roumanie                              |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                               | RU | Fédération de Russie                  |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                              | SD | Soudan                                |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                  | SE | Suède                                 |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                    | SG | Singapour                             |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |  |    |                                       |    |                       |

## LA GLYCINE BÉTAÏNE POUR SON USAGE ANTITHROMBOTIQUE.

L'invention consiste en l'utilisation de la glycine bêtaïne pour éliminer les atteintes physiopathologiques vasculaires. L'invention se rapporte à l'activité curative et préventive de la glycine bêtaïne dans la pathogénie des maladies thrombo-emboliques et hémostasiques d'origine artérielles ou veineuses.

La glycine bêtaïne a une activité préventive en empêchant la formation des thrombi et une activité curative empêchant la prolifération des thrombi en les détruisant. L'intérêt de l'invention réside dans le fait que l'utilisation de la glycine bêtaïne ne présente aucun risque hémorragique ou allergique par opposition aux molécules et traitements actuellement utilisés.

### ETAT DE LA TECHNIQUE

Les thromboses vasculaires sont une réponse de l'organisme face à l'agression de la paroi du vaisseau et de son contenu cellulaire et plasmatique. La thrombose est l'activation localisée de la coagulation avec constitution d'un thrombus.

L'intérêt suscité par cette pathologie ces dernières années a permis d'incriminer plusieurs facteurs :

- Le vaisseau, la paroi vasculaire et les cellules endothéliales
- Le rôle des éléments figurés du sang
- Les systèmes de coagulation, de fibrinolyse, et leurs inhibiteurs.

Il existe plusieurs types de thromboses qui peuvent survenir au niveau des artères, des veines, de la microcirculation des organes, des cavités du cœur et des surfaces artificielles en contact avec le sang. Les thromboses vasculaires sont une réponse de l'organisme à l'agression de la paroi du vaisseau et de son contenu cellulaire et plasmatique. La thrombose est une masse organisée d'éléments sanguins (plaquettes, globules rouges et globules blancs), de fibrine et d'autres protéines plasmatiques, qui est déposée à la surface ou qui obstrue la lumière du système vasculaire. Les mécanismes de la thrombose ressemblent à ceux de l'hémostase, mais

Les thromboses et les embolies sont la cause principale des complications cliniques des maladies cardio-vasculaires et de l'athérosclérose.

D'après Virchow, au moins trois types de facteurs thrombogènes déterminent la localisation, l'extension et la régression d'une thrombose :

- Les facteurs hémodynamiques et rhéologiques;
- La lésion endothéliale;

- 2 -

~~L'activation des constituants du sang, en particulier des plaquettes et de la coagulation qui aboutit à la formation de thrombine.~~

La maladie thrombo-embolique, d'origine artérielle ou veineuse reste une des causes principales de décès dans les pays développés.

La thrombose artérielle est souvent due à une rupture de la plaque d'athérosclérose alors que la thrombose veineuse résulte du déficit d'un inhibiteur de la coagulation (AT III) ou d'un déficit d'un activateur de la fibrinolyse (protéine S et/ou protéine C) ou plus fréquemment d'une stase. En effet, si tous les deux résultent d'une interaction entre le sang et la paroi vasculaire, la formation d'une thrombose veineuse et/ou par une anomalie de l'hémostase. La thrombose artérielle est le plus souvent secondaire à une anomalie pariétale et implique principalement les plaquettes sanguines. Elle contribue à une large variété de tableaux cliniques selon les lits artériels intéressés par l'interruption de la vascularisation. La thrombose peut atteindre principalement les artères cardiaques (coronaires), les artères des membres inférieurs, cérébrales ou digestives. Ainsi, la maladie artérielle favorise la formation du thrombus lui même responsable de la majorité des occlusions vasculaires terminales. De plus la participation du désordre de l'hémostase et du thrombus formé à d'autres lésions vasculaires est manifeste : aggravation des lésions de la paroi, ischémie et troubles de la microcirculation.

On peut distinguer trois stratégies thérapeutiques dans la prévention des accidents liés aux thromboses.

Les anticoagulants. Ils constituent l'élément majeur de la prise en charge d'un patient présentant une affection thrombo-embolique. L'héparine et ses dérivés sont couramment utilisés. Cependant, l'utilisation des héparines peut engendrer deux complications majeures, l'hémorragie ou la thrombopénie.

Les anti-vitamines K (AVK). Prescrites pour des traitements au long cours, elles ne peuvent être utilisées dans l'urgence et ne peuvent être prescrites simultanément avec d'autres anti-agrégants dont elles potentialisent l'effet hémorragique.

Les anti-agrégants plaquettaires. Prescrits pour prévenir la thrombose artérielle liée à l'athérosclérose. Actuellement les principaux inhibiteurs du fonctionnement plaquettaire prescrits sont : l'aspirine, la ticlopidine, le dipyridamole, et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le flurbiprofène et la prostacycline. Ces traitements possèdent une réelle efficacité toute en présentant des effets indésirables sur les patients à terrains allergiques ou hémorragiques.

Tous ces traitements malgré leur efficacité nécessitent des précautions particulières dans leurs utilisations, telles que l'administration d'antidotes, les problèmes de surdosages et les effets secondaires non désirables. Ces traitements impliquent un suivi nécessaire des patients, dû notamment aux problèmes hémorragiques qui peuvent survenir pendant ou après la médication ainsi qu'aux éventuelles incompatibilités avec d'autres médicaments. Il était donc intéressant de trouver une molécule à haut potentiel antithrombotique sans effets indésirables. De manière tout à fait surprenante la glycine bêtaïne est apparue comme possédant un haut potentiel thérapeutique dans le traitement des thromboses.

La glycine bêtaïne ou bêtaïne de formule  $(\text{CH}_3)_3\text{N}-----\text{CH}_2-----\text{COOH}$  est une molécule connue pour ses propriétés osmoprotectrices ainsi que pour ses utilisations cosmétiques et pharmaceutiques. Diverses applications pharmaceutiques de la bêtaïne sont connues et en particulier l'utilisation de la bêtaïne pour le traitement de l'homocystéinurie cause de troubles cardio-vasculaires (L. & B. Wilken J. Inher. Metab. Dis. 1997). Ainsi les

~~patients souffrant d'homocystéinurie, une anomalie génétique, présentent de manière~~  
prématurée des troubles athérosclérotiques et thrombo-emboliques ( SH. Mudd & al. The  
metabolic and molecular bases of inherited disease, 1995 ), ainsi que des maladies cardio-  
vasculaires ( Mc Cully . Atherosclerosis Rev 11, 1983 ). L'homocystéinurie est une déficience

héréditaire dont la forme homozygote est rare. On estime que la prévalence de la forme  
hétérozygote est de 1 pour 200 dans la population générale.  
L'homocystéinurie est due à des taux élevés d'homocystéine dans le plasma des patients  
atteints. L'administration de la bétaine permet d'abaisser la concentration d'homocystéine dans  
le sang.

Dans la publication WO 95 / 157 50, L'auteur afin de prévenir les désordres vasculaires  
chez les patients homocystéinuriques propose l'usage dans ses ingrédients de la bétaine.

La publication WO 98 / 19690 s'intéresse également aux patients souffrant d'un taux  
d'homocystéine élevé dans le sang. L'usage de la bétaine entre autres ingrédients est destiné à  
réduire le taux d'homocystéine dans le sang, étant établi que l'homocystéine est un facteur  
positif de risque dans l'occurrence des maladies cardio-vasculaires, ainsi que dans la maladie  
d'Alzheimer.

La publication EPO 347 864 décrit l'usage de la bétaine parmi ses ingrédients afin de  
lutter contre l'augmentation dans le plasma humain des groupes sulfhydryls dûs à la cystéine  
ainsi qu'à l'homocystéine, et ainsi inhiber la formation des plaques d'athérosclérose.

Cette activité anti-athérosclérotique est connue et largement documentée. Ces  
publications s'intéressent à l'activité de la bétaine sur le métabolisme des lipides ( Zapadnyuk  
& al. Biol. Med. 1987 ) ainsi que sur celui du cholestérol ( Panteleimonova & al . Farmakol.  
Toksikol , Moscow 1983 ).

La publication WO 97 38685 décrit l'utilisation de la bétaine et de la taurine afin de  
traiter les complications résultant de l'ischémie dans certains organes. L'ischémie est un arrêt  
localisé de la circulation sanguine et ne représente qu'une des pathologies dues à la thrombose.

La publication EPO 781 554 décrit dans ses exemples l'expérimentation sur des coeurs  
énucléés, c'est à dire des coeurs extraits et isolés du système vasculaire. L'utilisation de la  
bétaine pour ses propriétés osmoprotectrices et antiradicalaires connues permet ici aux auteurs  
de revendiquer son rôle protecteur du muscle cardiaque.

D'autres formes de bétaines ont été proposées ( WO 97 / 06795 ) sans égaler à ce jour  
l'activité et les performances de la glycine bétaine.

Aucune de ces publications ne dévoile l'activité de la glycine bétaine vis à vis de la  
thrombose veineuse et/ou artérielle, ni son activité anti-agrégante et anticoagulante.

La glycine bétaine dans le cadre de la présente invention peut être utilisée pour diverses  
applications cliniques telles que :

- Thromboses coronariennes et thromboses veineuses
- Infarctus, angine de poitrine, anévrisme, embolie pulmonaire, phlébite
- Les embolies cérébrales
- les chocs post-traumatiques d'origine chirurgicale ou non.
- La prévention des accidents de microcirculation dans les cas suivants : hémophilie,  
chimiothérapie, âge, contraception orale par les oestrogènes, obésité, tabagisme,  
prothèse.
- La prévention des risques liés à l'administration des produits de contraste ioniques  
et non ioniques.

## MATERIELETMETHODE

### A/ Principe de la thrombose induite par laser.

(Seiffge D. et al., 1989 ; Weichter W. et al., 1983)

Dans ce modèle, la lésion de la paroi vasculaire est induite par un faisceau laser. Ce faisceau entraîne une lésion limitée de l'endothélium vasculaire (seulement 1 à 2 cellules sont détruites). La mise à nu du sous-endothélium, surface thrombogène, amène l'adhésion des plaquettes par l'intermédiaire de la glycoprotéine Ib. Cette adhésion des plaquettes est suivie par leur activation. Elles forment des pseudopodes et sécrètent le contenu de leurs granules. Cette activation entraîne l'apparition de la glycoprotéine IIb-IIIa nécessaire à l'agrégation des plaquettes entre elles. Cette lésion est induite au niveau de la microcirculation mésentérique du rat. Elle est immédiatement suivie par la formation d'un thrombus (quelques secondes). Ce thrombus qui grossit rapidement, sous l'effet du flux sanguin, embolise avant de se former à nouveau.

Dans ce dispositif l'évaluation de l'effet de la glycine bêtaïne a été menée conjointement à l'étude de deux molécules pharmacologiquement actives utilisées comme référence: l'acide acétylsalicylique et l'héparine ( de bas poids moléculaire ). L'évaluation a également porté sur l'activité de la glycine bêtaïne par rapport aux effets prothrombotiques induits par les produits de contraste.

### B/ Thrombose induite par stase.

Une laparotomie est effectuée pour dégager la veine cave inférieure sur laquelle on pratique une ligature à To, à To + 2h injection sous cutanée de la glycine bêtaïne, à To + 6h prélèvement du caillot.

### C/ Protocole expérimental.

Pour ces études on a utilisé des rats Wistar mâles. Leur poids est compris entre 200 et 250 grammes. Après une période de stabulation de 8 jours, les rats sont soumis à un jeûne de 12 heures. Ils sont ensuite anesthésiés, la glycine bêtaïne est administrée par voie sous cutanée et le mésentère (laser ) ou la veine cave ( stase) sont dégagés aux fins des expérimentations.

**EXEMPLES:**

**Exemple 1 : Evaluation du nombre d'embolies et de la durée d'embolisation après altération vasculaire par les tirs lasers**

|   | Nombre d'embolies | Durée d'embolisation (minutes) |
|---|-------------------|--------------------------------|
| <b>Témoin négatif<br/>NaCl 0.9%</b>         | $5.33 \pm 0.58$   | $2 \pm 0$                      |
| <b>Glycine bétaine 5mg/kg</b>               | $2 \pm 0$         | $1 \pm 0$                      |
| <b>Acide acétylsalicylique<br/>100mg/kg</b> | $1 \pm 1$         | $0,33 \pm 0,58$                |
| <b>Héparine 2 mg/kg</b>                     | $2,67 \pm 0,58$   | $1 \pm 0$                      |

La glycine bétaine réduit d'une façon significative le nombre d'embolies et le temps d'embolisation après altération vasculaire par des tirs lasers. Ces résultats démontrent sa puissante activité anti-thrombotique.

**Exemple 2 : Evaluation du temps d'hémorragie provoquée**

( E. Dejana. Bleeding time in rats . Thrombosis. Rech. 1982 )

|   | THP (secondes)     |
|---|--------------------|
| <b>Témoin négatif<br/>NaCl 0.9%</b>         | $101.52 \pm 5.7$   |
| <b>Glycine bétaine 5mg/kg</b>               | $95 \pm 5$         |
| <b>Acide acétylsalicylique<br/>100mg/kg</b> | $276,67 \pm 20,82$ |
| <b>Héparine 2 mg/kg</b>                     | $313,33 \pm 20$    |

Les résultats montrent que la glycine bétaine maintient le temps d'hémorragie provoquée dans les valeurs du témoin négatif. La glycine bétaine en plus de son activité anti-thrombotique n'engendre pas de risques hémorragiques comparativement aux témoins positifs.

- 6 -

~~Exemple 3: Evaluation de l'aggrégation plaquettaire après altération vasculaire par les tirs lasers~~

5 ( Cardinal &amp; Flower. Pharmacol. Method. 1980 )

|                                     | Amplitude (Ohms) | Vélocité (Ohms/min) |
|-------------------------------------|------------------|---------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | 13 ± 1           | 9 ± 1               |
| Glycine bétaine 5mg/kg              | 0.66 ± 1.15      | 1.66 ± 1.15         |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | 2,33 ± 2.08      | 2 ± 1               |
| Héparine 2 mg/kg                    | 4.33 ± 0.57      | 2.66 ± 0.50         |

Les résultats démontrent l'activité anti-agrégante de la glycine bétaine.

10

**Exemple 4 : Evaluation de l'effet de la vis à vis des cellules sanguines**  
**a/ Dénombrement des plaquettes**

|                                     | Nombre de plaquettes ( $10^9$ ) |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | 788 ± 30.14                     |
| Glycine bétaine 5mg/kg              | 804.67 ± 20.03                  |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | 855.33 ± 63.17                  |
| Héparine 2 mg/kg                    | 777.33 ± 6.43                   |

15

**b/ Dénombrement des globules blancs**

|                                     | Nombre des globules<br>blancs ( $10^9$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | 5.03 ± 0.20                              |
| Glycine bétaine 5mg/kg              | 4.43 ± 0.32                              |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | 4.33 ± 1.00                              |
| Héparine 2 mg/kg                    | 5.80 ± 0.10                              |



## c/ Dénombrement des globules rouges

5

|                                     | Nombre des globules rouges ( $10^{12}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $6.56 \pm 0.15$                          |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg              | $6.19 \pm 0.25$                          |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $6.15 \pm 0.31$                          |
| Héparine 2 mg/kg                    | $6.20 \pm 0.20$                          |

Le dénombrement des éléments figurés du sang reste dans les valeurs du témoin négatif et démontre l'innocuité de la glycine bêtaïne

10

## Exemple 5 : Bilan biologique

## a/ Temps de Quick

|                                     | TQ (secondes)    |
|-------------------------------------|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $17 \pm 1$       |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg              | $16.9 \pm 1.05$  |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $18.33 \pm 2.08$ |
| Héparine 2 mg/kg                    | $29.50 \pm 0.52$ |

15

## b/ Temps de céphaline activée (TCA)

|                                     | TCA (secondes)   |
|-------------------------------------|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $20.5 \pm 0.5$   |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg              | $39.9 \pm 1.05$  |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $27.26 \pm 1.1$  |
| Héparine 2 mg/kg                    | $39.46 \pm 1.36$ |

## c/ Dosage du fibrinogène

5

|                                     | Fibrinogène (g/l) |
|-------------------------------------|-------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $2.45 \pm 0.19$   |
| Glycine bétaïne 5mg/kg              | $1.7 \pm 0.1$     |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $2.19 \pm 0.33$   |
| Héparine 2 mg/kg                    | $2.13 \pm 0.25$   |

d/ Dosage de l'alpha.2-Antiplasmine ( $\alpha$ 2AP)

10

|                                     | $\alpha$ 2AP (%) |
|-------------------------------------|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $30.16 \pm 0.85$ |
| Glycine bétaïne 5mg/kg              | $29.7 \pm 0.68$  |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $29.36 \pm 0.92$ |
| Héparine 2 mg/kg                    | $29.4 \pm 1.01$  |

## e/ Dosage de l'Antithrombine III (AT III)

15

|                                     | AT III (%)       |
|-------------------------------------|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%         | $86 \pm 3$       |
| Glycine bétaïne 5mg/kg              | $89.5 \pm 1.37$  |
| Acide acétylsalicylique<br>100mg/kg | $85.33 \pm 3.51$ |
| Héparine 2 mg/kg                    | $77.66 \pm 1.52$ |

**Exemple 6: Evaluation de l'activité de la glycine bêtaïne en fonction du temps**

5

**Groupes expérimentaux :** Le produit est testé à 5 mg/ kg  
Thrombose induite par laser

10

|            |  |
|------------|--|
| Contrôle   | NaCl 0,9%  |
| Groupe I   | Le produit est injecté 1 heure avant l'expérimentation   |
| Groupe II  | Le produit est injecté 2 heures avant l'expérimentation  |
| Groupe III | Le produit est injecté 24 heures avant l'expérimentation |
| Groupe IV  | Le produit est injecté 48 heures avant l'expérimentation |

15

a) Effet du produit testé ( 5 mg/ml/kg ) sur le Temps d'Hémorragie Provoquée.

| Groupes    | T.H.P ( secondes ) |
|------------|--------------------|
| NaCl 0.9 % | 110 ± 21,2         |
| I          | 105 ± 26,2         |
| II         | 145 ± 15,52        |
| III        | 115,5 ± 14,2       |
| IV         | 120 ± 10,13        |

20

b) Effet du produit testé ( 5 mg/ml/kg ) sur la thrombose artérielle induite par faisceau laser

| Groupes    | Nombre de tirs | Nombre d'embolies | durée d'embolisation ( minutes ) |
|------------|----------------|-------------------|----------------------------------|
| NaCl 0,9 % | 2,5 ± 0,84     | 5,7 ± 1,5         | 2,1 ± 0,69                       |
| I          | 3,49 ± 1,07    | 1,8 ± 1,44        | 0,51 ± 0,5                       |
| II         | 3,0 ± 1,5      | 1,4 ± 1,18        | 0,3 ± 0,23                       |
| III        | 2,50 ± 1,25    | 1,99 ± 0,4        | 1,00 ± 0,5                       |
| IV         | 2,7 ± 1,0      | 2,2 ± 0,69        | 1,5 ± 0,6                        |

~~c) Effet du produit testé (5 mg/kg) sur l'aggrégation plaquettaire induite par stase.~~

| Groupes    | Amplitude ( Ohms ) | Vélocité<br>( Ohms / minutes ) |
|------------|--------------------|--------------------------------|
| NaCl 0,9 % | $24,23 \pm 0,5$    | $14,4 \pm 2,3$                 |
| I          | $11,33 \pm 3,08$   | $8,2 \pm 0,2$                  |
| II         | $13,2 \pm 3,5$     | $9,3 \pm 1,8$                  |
| III        | $12,7 \pm 4,1$     | $8,7 \pm 1,3$                  |
| IV         | $13 \pm 2,8$       | $8,7 \pm 1,15$                 |

5

d) Evaluation de l'effet de la glycine bétaïne sur les facteurs de coagulation après administration répétitive sur 5 jours de traitement.

|                                      | TCA<br>( secondes ) | Temps de Quick<br>( secondes ) | Fibrinogène<br>g / l |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| Témoin non traité                    | $21,25 \pm 2,3$     | $16,1 \pm 1,0$                 | $3,03 \pm 0,45$      |
| Glycine bétaïne<br>( 5 mg / kg / j ) | $39,3 \pm 2,3$      | $19,8 \pm 1,2$                 | $2,2 \pm 0,1$        |

10

Exemple 7 : Evaluation de l'effet de la glycine bétaïne sur la thrombose veineuse induite par stase.

a) Effet de la glycine bétaïne sur le poids du caillot

15

|                                  | Poids du caillot ( mg ) |
|----------------------------------|-------------------------|
| Témoin non traité                | $4,033 \pm 2$           |
| Glycine bétaïne<br>( 1mg/kg )    | $3,1 \pm 0,4$           |
| Glycine bétaïne<br>( 2,5 mg/kg ) | $1,63 \pm 0,76$         |
| Glycine bétaïne<br>( 5mg/kg )    | $0,76 \pm 0,4$          |

- 11 -

**1b) Evaluation de l'effet de la glycine bétaïne sur le plasminogène**

|                                    | Plasminogène<br>% |
|------------------------------------|-------------------|
| NaCl 0,9 %                         | $2,7 \pm 0,33$    |
| Glycine bétaïne<br>( 5 mg / kg )   | $1,66 \pm 0,58$   |
| Glycine bétaïne<br>( 2,5 mg / kg ) | $2 \pm 0,15$      |
| Glycine bétaïne<br>( 1 mg / kg )   | $2,44 \pm 0,58$   |

5 **c) Evaluation de l'effet de la glycine bétaïne sur la coagulation**

|                                  | TCA<br>( secondes ) | Temps de Quick<br>( secondes ) | Fibrinogène<br>g / l |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| Témoin non traité                | $30,2 \pm 2,7$      | $16,1 \pm 1,0$                 | $3,03 \pm 0,45$      |
| Glycine bétaïne<br>( 1 mg/kg )   | $29,1 \pm 2,3$      | $16,2 \pm 1,2$                 | $2,63 \pm 0,3$       |
| Glycine bétaïne<br>( 2,5 mg/kg ) | $31,2 \pm 2,6$      | $16,6 \pm 0,7$                 | $2,2 \pm 0,17$       |
| Glycine bétaïne<br>( 5 mg/kg )   | $33,5 \pm 1,9$      | $15,6 \pm 0,4$                 | $2,32 \pm 0,33$      |

10 **d) Evaluation de l'effet de la glycine bétaïne sur les facteurs de coagulation**

|                                    | Anti Xa<br>unité / ml | Anti IIa<br>unité / ml |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Glycine bétaïne<br>( 5 mg / kg )   | $0,35 \pm 0,15$       | —                      |
| Glycine bétaïne<br>( 2,5 mg / kg ) | $0,14 \pm 0,10$       | —                      |
| Glycine bétaïne<br>( 1 mg / kg )   | $0,08 \pm 0,1$        | —                      |

~~Le traitement avec la glycine bêtaïne inhibe les complications thrombo-emboliques déclenchées par les firs lasers.~~ En effet, ce traitement avec la glycine bêtaïne, avant les firs lasers diminue l'adhésion des plaquettes et leur agrégation au niveau vasculaire.

5 Le traitement avec la glycine bêtaïne inhibe les complications thrombo-emboliques. En effet, ce traitement avec la glycine bêtaïne, avant l'induction de la thrombose, a montré un haut potentiel antithrombotique au niveau de tous les paramètres entrant en jeu dans le processus de la formation du thrombus. De plus, les résultats des paramètres biologiques démontrent la parfaite innocuité de la glycine bêtaïne qui contrairement aux produits de référence utilisés (aspirine et héparine), n'induit aucun effet hémorragique ni d'effet secondaire indésirable. Ces  
10 caractéristiques confèrent à la glycine bêtaïne, en plus de son efficacité démontrée, la particularité de pouvoir être administrée aux personnes à risque hémorragique ainsi qu'aux personnes qui présenteraient des risques de sensibilité ou d'allergie face aux traitements antithrombotiques conventionnels (hémophiles, allergiques). La glycine bêtaïne ne provoquant  
15 de thrombopénies ou désordres hémorragiques (exemples 2 & 4). Le résultat expérimental de l'exemple 5, c, démontre une consommation du fibrinogène.

Il est à noter que, dans les mêmes conditions expérimentales, pour la conservation du sang la glycine bêtaïne est apparue comme possédant un haut pouvoir anti-coagulant  
20 comparativement à des tubes héparinés ou contenant de l'E.D.T.A. Les doses actives de glycine bêtaïne sont apparues entre 3 et 5 mg par tube à hémolyse. Ce résultat expérimental démontre un haut potentiel anticoagulant de la glycine bêtaïne. L'utilisation de la glycine bêtaïne comme anticoagulant peut être revendiquée, tant pour le traitement du corps humain in vivo, que pour la conservation du sang ex vivo.

#### 25 **Evaluation de l'activité de la glycine bêtaïne vis à vis des produits de contraste.**

Dans le cadre de la recherche sur les effets anti-thrombotiques et dans le souci de compléter l'approche de l'efficacité de la glycine bêtaïne, nous avons évalué l'effet de la  
30 glycine bêtaïne sur l'augmentation des risques thrombo-emboliques liés à l'utilisation des produits de contraste connus pour leurs pouvoirs prothrombotiques. L'intérêt représenté par l'utilisation de ce modèle est qu'il permet l'observation directe de la formation du thrombus au site de la lésion vasculaire. Ces résultats expliquent l'apparition d'occlusions thrombotiques lors des angioplasties, surtout chez des patients, dont l'endothélium est déjà endommagé ou  
35 lésé. L'angioplastie coronaire cause une dénudation de l'endothélium, exposant le collagène, l'élastine et les cellules musculaires lisses au sang circulant, en analogie avec le modèle de thrombose expérimentale utilisé. Ainsi, l'apparition de nouveaux thrombi est plus élevée chez des patients présentant un infarctus du myocarde récent ou une plaque coronaire excentrique.

L'administration des produits de contraste, diminue le nombre de globules blancs, le  
40 nombre de globules rouges et le nombre de plaquettes. Les produits de contraste interagissent avec les leucocytes, induisent la libération de leukotriènes, augmentent la perméabilité vasculaire et exercent un effet chimiotactique. De plus, les produits de contraste agissent sur le contrôle de l'expression de la P-selectine et provoquent l'adhésion des globules blancs à l'endothélium vasculaire. Il a été démontré que l'utilisation des produits de contraste était  
45 associée avec l'apparition de thrombi d'importance variable en fonction du produit utilisé.

Deux produits de contrastes ont été étudiés : Hexabrix® (ionique) et Iopamidol ® (non ionique)

- 13 -

~~Exemple 8 : Evaluation du nombre d'embolies et de la durée d'embolisation après altération vasculaire par les tirs lasers et administration des produits de contrastes.~~

|  | Nombre d'embolies | Durée d'embolisation (minutes) |
|--|-------------------|--------------------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | $5.33 \pm 0.58$   | $2 \pm 0$                      |
| Hexabrix®                              | $8 \pm 1$         | $3.67 \pm 0.58$                |
| Iopamidol®                             | $11.67 \pm 0.50$  | $6.33 \pm 0.52$                |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | $4 \pm 1$         | $2 \pm 0$                      |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | $5.33 \pm 0.58$   | $2.33 \pm 0.48$                |

5

Exemple 9 : Evaluation du temps d'hémorragie provoquée (THP)

|  | THP (secondes)   |
|--|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | $101.52 \pm 5.7$ |
| Hexabrix®                              | $195 \pm 13.23$  |
| Iopamidol®                             | $128 \pm 7.64$   |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | $150 \pm 5$      |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | $111 \pm 6.60$   |

10 Exemple 10: Evaluation de l'agrégation plaquettaire après altération vasculaire par les tirs lasers

|  | Amplitude (Ohms) | Velocité (Ohms/min) |
|--|------------------|---------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | $13 \pm 1$       | $9 \pm 1$           |
| Hexabrix®                              | $6 \pm 1$        | $5.66 \pm 0.57$     |
| Iopamidol®                             | $15 \pm 2.64$    | $12.33 \pm 0.50$    |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | $2 \pm 1$        | $5 \pm 0$           |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | $4.66 \pm 0.52$  | $9.33 \pm 0.8$      |

~~Exemple 11 - Evaluation de l'effet de la glycine bêtaïne sur les cellules sanguines~~

## a/ Dénombrement des plaquettes

5

|  | Nombre plaquettes ( $10^9$ ) |
|--|------------------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 788.33 $\pm$ 30.14           |
| Hexabrix®                              | 620 $\pm$ 10                 |
| Iopamidol®                             | 585.67 $\pm$ 23.54           |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 669.67 $\pm$ 7.37            |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 704.33 $\pm$ 92.33           |

## b/ Dénombrement des globules blancs

|  | Nombre globules blancs<br>( $10^{12}$ ) |
|--|---|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 5.03 $\pm$ 0.20                         |
| Hexabrix®                              | 2.96 $\pm$ 0.21                         |
| Iopamidol®                             | 3.06 $\pm$ 0.35                         |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 4.20 $\pm$ 0.1                          |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 3.9 $\pm$ 0.3                           |

10

## c/ Dénombrement des globules rouges

|  | Nombre globules rouges<br>( $10^9$ ) |
|--|--------------------------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 6.56 $\pm$ 0.15                      |
| Hexabrix®                              | 5.43 $\pm$ 0.47                      |
| Iopamidol®                             | 5.5 $\pm$ 0.36                       |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 6.5 $\pm$ 0.15                       |
| Glycine bêtaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 6.6 $\pm$ 0.19                       |



~~Exemple 12 : Bilan biologique~~

## a/ Temps de Quick

5

|  | TQ (secondes) |
|--|---------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 17 ± 1        |
| Hexabrix®                              | 24.13 ± 1     |
| Iopamidol®                             | 28.1 ± 0.75   |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 16.36 ± 0.56  |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 17.83 ± 1.2   |

## b/ Temps de céphaline activé (TCA)

|  | TCA (secondes) |
|--|----------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 20.5 ± 0.5     |
| Hexabrix®                              | 49.3 ± 1.85    |
| Iopamidol®                             | 41.33 ± 0.8    |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 25.4 ± 0.61    |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 22.4 ± 0.7     |

10

## c/ Dosage du fibrinogène

|  | Fibrinogène (g/l) |
|--|-------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 2.45 ± 0.19       |
| Hexabrix®                              | 1.49 ± 0.18       |
| Iopamidol®                             | 1.5 ± 0.8         |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 1.7 ± 0.09        |
| Glycine bétaïne 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 1.9 ± 0.1         |

d/ Dosage de l'alpha.2-Antiplasmine ( $\alpha$ 2AP)

|  | $\alpha$ 2AP (%) |
|--|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 30.16 $\pm$ 0.85 |
| Hexabrix®                              | 23.26 $\pm$ 1.06 |
| Iopamidol®                             | 25.23 $\pm$ 0.95 |
| Glycine bétaine 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 25.66 $\pm$ 0.64 |
| Glycine bétaine 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 28.13 $\pm$ 0.8  |

## e/ Dosage de l'Antithrombine III (AT III)

|  | AT III (%)       |
|--|------------------|
| Témoin négatif<br>NaCl 0.9%            | 86.3 $\pm$ 3     |
| Hexabrix®                              | 81.63 $\pm$ 0.66 |
| Iopamidol®                             | 70.6 $\pm$ 1.51  |
| Glycine bétaine 5mg/kg +<br>Hexabrix®  | 79.1 $\pm$ 1.05  |
| Glycine bétaine 5mg/kg +<br>Iopamidol® | 87.26 $\pm$ 0.9  |

Le traitement avec la glycine bétaine inhibe les complications thrombo-emboliques associées à l'utilisation des produits de contraste. En effet, ce traitement avec la glycine bétaine, avant ou pendant l'injection des produits de contraste, diminue l'adhésion des plaquettes et leur agrégation au niveau vasculaire. Ces résultats démontrent l'effet anti-thrombotique et thrombolytique de la glycine bétaine. Il est à noter que les produits de contraste peuvent avoir d'autres effets secondaires telle que la stase sanguine au niveau des cathéters et les lésions endothéliales causées par les procédures d'administrations elles-mêmes. La glycine bétaine remédie à ces effets indésirables.

-37-

## 5 CONCLUSION

La glycine bêtaïne possède les mêmes, voire de meilleures, caractéristiques thérapeutiques que les anticoagulants et les anti-agrégants étudiés (acide acétylsalicylique et l'héparine ), tout en ne présentant aucun effet indésirable.

Les performances supérieures en terme d'efficacité thérapeutique de la glycine bêtaïne par rapport à ces deux molécules ( acide acétylsalicylique et héparine ) incitent à la formulation d'un médicament ayant pour principe thérapeutiquement actif la glycine bêtaïne. Ce médicament étant destiné au traitement des thromboses et des affections thrombo-emboliques.

Selon les résultats exposés ce médicament revendique aussi les indications anticoagulant, anti-agrégant et fibrinolytique. L'innocuité démontrée de cette molécule permet d'envisager des traitements à long terme sans pour autant nécessiter une surveillance biologique.

L'intérêt de l'utilisation de la glycine bêtaïne réside dans le fait qu'elle agit à plusieurs niveaux de l'hémostase à savoir au niveau de l'agrégation plaquettaire, au niveau de la coagulation et au niveau fibrinolytique. Cette activité est durable et évite des administrations répétitives ce qui constitue une amélioration notable par rapport aux traitements existant. L'administration de la bêtaïne n'induit aucun risque hémorragique, ni autres effets secondaires ( ex : thrombopénie induite à l'héparine ) ce qui constitue une avancée majeure en thérapeutique antithrombotique.

### REVENDICATIONS

- 5
1. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les thromboses non induites par l'homocystéinurie.
  2. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les affections thrombo-emboliques non induites par l'homocystéinurie.
  - 10 3. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les désordres de la coagulation du sang chez un patient.
  4. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les désordres de l'agrégation plaquettaire chez un patient.
  - 5 5. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à lyser  
15 un thrombus.
  6. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les thromboses chez les sujets à risque hémorragique.
  7. Utilisation de la glycine bêtaïne comme agent anticoagulant pour la conservation du sang ex-vivo.
  - 20 8. Utilisation de la glycine bêtaïne pour l'obtention d'un médicament destiné à contrecarrer les effets thrombo-emboliques induits par les produits de contraste.
  9. Utilisation de la glycine bêtaïne selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle puisse être simultanément administrée avec des produits de contraste à un patient.
  10. Utilisation de la glycine bêtaïne comme principe actif selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'une quantité efficace de glycine bêtaïne est associée à un support, véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.